



TITLE:

A Skeletal Muscle Model of Infantile-onset  
Pompe Disease with Patient-specific iPS  
Cells( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Yoshida, Takeshi

---

CITATION:

Yoshida, Takeshi. A Skeletal Muscle Model of Infantile-onset Pompe Disease with Patient-specific iPS Cells. 京都大学, 2019, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2019-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21445>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏 名	吉 田 健 司
論文題目	A Skeletal Muscle Model of Infantile-onset Pompe Disease with Patient-specific iPS Cells (乳児型 Pompe 病特異的 iPS 細胞を用いた骨格筋病態モデル)		
(論文内容の要旨)			
<p>【緒言】Pompe 病（糖原病 II 型）は、ライソゾーム酵素の酸性 <math>\alpha</math>-グルコシダーゼ（GAA）欠損により、骨格筋や心筋のライソゾームにグリコーゲンが蓄積する遺伝性疾患である。GAA が完全に欠損する乳児型 Pompe 病では早期から全身の筋力低下と心不全を来とし、2 歳までにほぼ全例が死亡する。唯一の治療である遺伝子組換えヒト GAA（rhGAA）の補充療法により、乳児型 Pompe 病の生命予後は著明に改善したが、骨格筋症状への効果は不十分である。また、ライソゾーム内のグリコーゲン蓄積が筋細胞障害を起こす機序も十分には解明されていない。</p> <p>【目的】乳児型 Pompe 病患者由来 iPS 細胞を用いて骨格筋病態を再現し、新規治療開発及び病態解明の基盤となるモデルを確立する。</p> <p>【方法】乳児型 Pompe 病患者 3 例及び健常対象者 3 例から iPS 細胞を樹立し、骨格筋分化のマスター制御因子 MyoD を強制発現させることで骨格筋細胞に分化誘導した後、両者の比較解析を行った。</p> <p>【結果】未分化患者 iPS 細胞において GAA が欠損していることを確認し、グリコーゲンの著しい蓄積は認めないことを確認した。</p> <p>患者および対象者 iPS 細胞の両者の骨格筋細胞への分化誘導には明らかな差は認めなかった。患者 iPS 細胞由来筋細胞では、PAS 染色（多糖類を検出）で濃染する顆粒状構造物を核周囲に無数に認め、それらは免疫染色で LAMP2（ライソゾームマーカー）陽性であった。電子顕微鏡上も一重膜構造物内にグリコーゲンの蓄積を認めた。これらより、患者 iPS 細胞由来筋細胞では Pompe 病の特徴であるライソゾームへのグリコーゲン蓄積を認めると考えられた。さらに、誘導した筋細胞を、グルコースを含まない培地で一時的に培養した後にグリコーゲン定量を行ったところ、患者 iPS 細胞由来筋細胞では対象と比べて著明に多いグリコーゲンが残存していた。これらの残存グリコーゲンは培地中に rhGAA を加えると、濃度依存的に減少した。これらの結果から、患者 iPS 細胞を用いた乳児型 Pompe 病の骨格筋モデルの確立に成功したと考えられた。</p> <p>次に、確立した患者 iPS 細胞由来骨格筋モデルを用いて、ライソゾームが関与するシグナル伝達に重要なラパマイシン標的タンパク質複合体 1（mTORC1）の活性を評価した。mTORC1 のターゲットである S6K および 4E-BP1 のリン酸化を解析したところ、患者 iPS 細胞由来筋細胞では mTORC1 の活性が低下しており、rhGAA 補充により部分的に改善した。様々な代謝を調整している mTORC1 の影響を調べる目的でメタボローム解析を行ったところ、患者 iPS 細胞由来筋細胞では細胞内エネルギー代謝指数が悪化していた。ミトコンドリア形態を MitoTracker で解析すると、患者と対象で有意な差は認めなかったが、rhGAA 補充により一部 MitoTracker 蛍光量が変化し、エネルギー代謝の悪化にミトコンドリアの関与が示唆された。mTORC1 と関連しているオートファジーに関しては明らかな変化は認めなかった。また、患者 iPS 細胞由来筋細胞におけるトランスクリプトーム</p>			

解析では、rhGAA 補充により細胞周期や細胞増殖に関連する遺伝子の発現が変化しており、この結果からも mTORC1 関連シグナルの変化が示唆された。

【結論】患者由来 iPS 細胞を用いて乳児型 Pompe 病骨格筋モデルの確立に成功した。さらに、mTORC1 関連ライソゾームシグナル伝達の変化が、筋細胞障害の初期病態に関与している可能性が示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

乳児型 Pompe 病は、ライソゾーム酵素である酸性  $\alpha$ -グルコシダーゼ（GAA）欠損により、骨格筋や心筋にグリコーゲンが蓄積する遺伝性疾患である。唯一の根治療法である GAA 補充療法の骨格筋への効果は不十分であり、病態も完全には解明されていない。本研究では、患者 iPS 細胞を用いて乳児型 Pompe 病の病態解析に使用可能な骨格筋病態モデルの構築を目的とした。

申請者は、乳児型 Pompe 病患者と健常対照者 3 例ずつから iPS 細胞を樹立し、骨格筋分化のマスター制御因子 MyoD の強制発現により骨格筋細胞を分化誘導した。その結果、患者 iPS 細胞由来筋細胞では Pompe 病の特徴であるライソゾームへのグリコーゲン蓄積を認め、GAA 補充により改善することを確認した。さらに、患者 iPS 細胞由来筋細胞では、ライソゾームが関与するシグナル伝達に重要なラパマイシン標的タンパク質複合体 1（mTORC1）の活性化が抑制され、細胞周期や細胞増殖に関連する遺伝子発現の変化や、エネルギー状態の悪化が示唆される所見を認めた。

以上より、申請者は患者 iPS 細胞を用いて乳児型 Pompe 病の骨格筋病態を再現し、ライソゾームへのグリコーゲン蓄積による mTORC1 活性低下とその下流のシグナル変化が骨格筋初期病態に関与している可能性を示した。

以上の研究は乳児型 Pompe 病の病態解明に貢献し、小児神経筋疾患研究の発展に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 30 年 10 月 16 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公表可能日 年 月 日